



EFICIÊNCIA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURA NÃO SACCHAROMYCES NA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL.

RODRIGO EMANUEL CELESTINO DOS SANTOS

RESUMO

Ao que se refere à produção de alimentos, vinhos e cerveja o homem tem se beneficiado dos processos fermentativos de microrganismos que estão presentes em todos os ambientes, inclusive na indústria, em função do seu metabolismo completo quanto à fermentação. É nesse caminho que *Dekkera bruxellensis* se evidencia enquanto uma levedura dinâmica neste ambiente, ora atuando como um agente contaminante, ora favorecendo o produto final. Por já existir evidências científicas a seu respeito empregando-a enquanto uma levedura não *saccharomyces* capaz de produzir bioetanol, notamos que é imperioso estudá-la para além de sua notoriedade enológica, visto que embora já saibamos sobre sua ação na deterioração do vinho faz-se pertinente conhecer o seu potencial biotecnológico na fermentação alcoólica. O objetivo deste trabalho circunda neste universo, buscando notar, portanto, quais os fatores que proporcionam o seu sucesso adaptativo no cenário fermentativo industrial para, com isso, elencar a eficiência de *D. bruxellensis* como uma levedura que pode – e deve - ser utilizada em futuras aplicações para a produção de etanol de segunda geração, principalmente pelo fato de buscarmos, diante dos aumentos no preço do petróleo, por uma alternativa energética renovável. Nesse rumo, convém lembrar que combustíveis sustentáveis a partir de biomassa lignocelulósica caracteriza-se como um avanço na produção variada de energia, característica esta que podemos lhe atribuir, visto que é um fungo que pode crescer e produzir álcool a partir da celobiose. Em vista deste seu evidente valor para a Biotecnologia é que justificamos este estudo e, nesse rumo, esperamos demonstrar que as suas linhagens se caracterizam promissoras na produção de combustível e, somado a isso, elucidar o quão podem se demonstrar tolerantes aos mais diversos estresses industriais (osmótico, ácido, oxidativo, etanólico e térmico). Desse modo, cientes do seu alto teor fermentativo e de sua capacidade de suplantar até a *Saccharomyces cerevisiae*, que é a atual estrela da indústria, ressaltamos a importância biotecnológica que tem *Dekkera bruxellensis* à produção de álcool combustível.

Palavras-chave: *Dekkera bruxellensis*; Produção de etanol; Álcool a partir de leveduras; Biotecnologia; Produção de energia sustentável.

1 INTRODUÇÃO

Na fermentação para produção de etanol, no Brasil, podemos afirmar que se utiliza a cana-de-açúcar, após a centrifugação, como reciclo de microrganismos fermentativos e tal procedimento ocorre durante toda a safra, como observou Wheals et Al. (1999). Atribui-se a este ato de fermentar, nesse sentido, a mudança no processo químico que modifica os substratos orgânicos no qual estão os microrganismos e pelo qual novas substâncias serão, a partir destes, propiciadas em uma variável quantidade e qualidade, conforme Silva (1994).

Segundo Souza-Liberal et Al. (2007), os substratos utilizados na indústria brasileira,

como no caso dos hidrolisados de bagaço, possibilitam que bactérias lácteas e inúmeras outros microrganismos cresçam, como no caso das leveduras que são seres eucarióticos unicelulares que se reproduzem assexuadamente. Existem espécies que são cultivadas essencialmente para produção de álcool combustível, a exemplo de *Saccharomyces cerevisiae* que já possui sua utilização bastante estabelecida nesse sentido.

Entretanto, não é somente o famoso levedo do pão que é referenciado na questão da fermentação industrial, pois, já há outra levedura com igual capacidade que, de acordo com Loureiro & Malfeito-Ferreira (2003), pode ser empregada como um agente contaminante do processo, mas também pode ser usada para atuar a favor do produto final. É nesse caminho que nos deparamos com uma levedura excelentemente adaptada ao nicho da fermentação alcoólica industrial, já conhecida na maioria das vinícolas, que é a *Dekkera bruxellensis*.

Sua classificação taxonômica põe esta levedura no Reino *Fungi*, atrelando-a ao Filo *Ascomycota*, subfilo *Saccharomycotina*, Classe *Saccharomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetacea*, Gênero *Dekkera*, espécie *D. bruxellensis*, conforme elucidou Barnett et Al. (1990). Por vezes, os estudos estão restringidos apenas a sua capacidade de deteriorar o vinho e não se ocupam de que, por meio da fermentação alcoólica, estão diante de uma levedura promissora produtora de combustível visto que possui a capacidade de assimilar o dissacarídeo formado na hidrólise parcial da celulose, a denominada celobiose.

Possuir um combustível sustentável mediante biomassa lignocelulósica é fundamental, tendo em vista a procura por uma forma limpa de energia. Assim, se faz imprescindível conhecer a ecologia de *D. bruxellensis* e como essa levedura tem se adaptado aos fatores de estresse industrial. Dados mostram que isolados dessa espécie tem a habilidade de produzir etanol com rendimentos próximo aos vistos por *S. cerevisiae*, pois, suas linhagens compartilham da capacidade de fermentar mesmo sem a presença de oxigênio, a partir da estratégia de consumir rapidamente os açúcares produzir e acumular etanol, tolerando este composto em condições de aerobiose (LEITE et Al., 2016).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi elaborada uma revisão de literatura integrativa que, nesse sentido, possibilita uma abordagem ampla, do ponto de vista metodológico, permitindo a inserção não apenas de estudos experimentais como também os não experimentais, assim como os textos teóricos e os empíricos. O propósito deste enfoque, de acordo com Souza et Al. (2010), abrange desde a análise dos percalços vistos nas metodologias, a revisão de teoria e de evidências até a designação de conceitos.

Este tipo de revisão envolve etapas distintas, tais como: a identificação de um tema, seleção da hipótese de pesquisa, critérios de inclusão/exclusão da amostragem na literatura, definição de informações que serão extraídas e sua respectiva categorização, avaliação dos estudos escolhidos, interpretação dos resultados e, por fim, apresentação e síntese do conhecimento oriundo desta revisão, conforme Mende et Al. (2008). Assim, o tema não é outro senão evidenciar que as linhagens de *Dekkera bruxellensis* se caracterizam promissoras na produção de combustível.

A questão hipotética de pesquisa desta revisão reside nos benefícios das futuras aplicações desta levedura para a produção biocombustível. Selecionamos, nesse cenário, os seguintes critérios de inclusão foram materiais teóricos como artigos científicos, dissertações e teses buscadas nas bases de dados, utilizando os descritores e suas combinações acerca de “*Dekkera bruxellensis* e produção de Etanol” em National Center for Biotechnology Information (PubMed), Google Acadêmico e The Scientific Electronic Library Online (SciELO).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de um escopo previamente delimitado por esta revisão bibliográfica integrativa, foi possível uma leitura dos artigos, dissertações e teses que corroboraram para a compreensão sobre real eficiência de utilizar *Dekkera bruxellensi* na produção de álcool combustível. Souza Liberal et Al. (2007) notaram que essa espécie apresenta capacidade de crescimento e adaptação nos substratos de produção de etanol e que sua dinâmica populacional, em relação a *Saccharomyces cerevisiae*, em sistemas contínuos industriais, aumenta mais rapidamente, justamente pela tolerância que possui aos estresses industriais.

Nessa perspectiva, Silva (1994) documentou o poder competitivo desta levedura ao notar a sua contaminação no fermento inicial em um processo contínuo na produção de etanol, no qual sua evolução populacional passou de 62% para 96% em apenas oito dias. O que nos leva a questionar, nesse rumo, sobre a sua tolerância aos fatores estressantes que ocorrem durante a fermentação industrial, levando em consideração que as condições geradoras vão desde acidez do meio a uma contaminação bacteriana ou até altas temperaturas.

As respostas a esses mais variados estresses possivelmente exigiriam de *Dekkera bruxellensi* a sua efetiva adaptabilidade às essas condições adversas. Pita et Al. (2011) discutiram e observaram que uma de suas principais características, ao que se refere a sua função fisiológica, é de que é são capazes de metabolizar carbono e assimilar nitrogênio e isso, provavelmente, garante à essa levedura uma vantagem, visto que o mosto preparado a partir da cana-de-açúcar (substrato mais utilizado no Brasil) é rico em nitrato.

Lima et Al. (2001) ressalta a influência não somente dos fatores físicos (temperatura e pressão osmótica) mas também químicos (pH, inibidores e oxigenação) sobre o processo fermentativo de leveduras. Conforme os autores, esses fatores afetam o rendimento da fermentação e, por conseguinte, a eficiência da conversão de açúcar para etanol. Nessa direção, Amorim (2005) chama atenção, pois, a frequente exposição à exaustão por estresse gera queda de viabilidade celular. Como *D. bruxellensis* supera *S. cerevisiae* nesse sentido?

Blomqvist et Al. (2010), nesse caminho, elucidam que há uma maior eficiência energética em *D. bruxellensis* pela questão de menor produção de glicerol. Convém lembrar que as leveduras, sob a limitação de oxigênio, são capazes de produzir glicerol com o intuito de oxidar NADH. Essa menor produção de glicerol acarreta outra vantagem a seu favor, visto que lhe possibilita o efeito *Custer*, ou seja, a inibição temporária de fermentação em condições anaeróbicas. Notamos, com isso, que sua fisiologia oferta-lhe vantagem adaptativa.

Delia et Al. (2009) com suas pesquisas, confirmam esta hipótese, pois, relatam que pelo fato desta espécie ser uma forte produtora de ácido acético, que é frequentemente considerado como um inibidor de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, causa, nesse âmbito, um decréscimo na sua capacidade fermentativa industrial uma vez que o açúcar do mosto que seria usado para produção de etanol é desviado para outros microrganismos não produtores de etanol e que, conseqüentemente, produzirão compostos tóxicos para *S. cerevisiae*.

Neste percurso, percebemos que a literatura científica tem discutido que a tolerância que *D. bruxellensis* exhibe frente a todos esses estresses favorecem essa levedura para aplicações na indústria onde as condições ambientais podem mudar rápido ou até em grandes fermentadores, sobretudo na fermentação de material lignocelulósico. Conforme Galafassi et Al. (2010), alguns trabalhos europeus tem proposto essa levedura como uma promissora produtora de álcool combustível. Notamos que seu genoma favorece isto, outra vantagem sua. Esta levedura dispõe de maior diversidade entre as cepas do que *S. cerevisiae*. Seu conteúdo genético, nesse sentido, pode variar significativamente desde

o número de cromossomo até variações citogenéticas e quanto a sua ploidia (BORNEMAN et Al. 2014). Rozpedowoska et Al. (2011) concluiu que *D. bruxellensis* possui propriedades genômicas interessantes que poderiam estar atreladas ao seu comportamento, elencando sua importância.

4 CONCLUSÃO

Podemos concluir com base na revisão bibliográfica integrativa sobre *Dekkera bruxellensis*, que esta levedura é altamente eficiente para produção de álcool, caracterizando-se como um modelo promissor devido a todas as habilidades intraespecíficas e a sua atividade metabólica. A partir da consulta à literatura científica disponível a seu respeito percebemos que suas linhagens são promissoras na produção de combustível e evidenciamos, assim, que a sua espécie demonstra-se tolerante aos mais diversos estresses industriais por possuir uma alta adaptabilidade a esse ambiente.

Seu potencial de aplicação industrial, no entanto, ainda é carente de estudos para se conhecer, afinal, qual é a influência desses fatores de estresse em seu metabolismo. No mais, notamos que *D. bruxellensis* está adaptada aos processos de fermentação nas dornas, visto que sua presença em tanques de vinhos enquanto agente contaminante é bastante conhecida. Sua capacidade de produção e competição com *S. cerevisiae* a torna um microrganismo que vem despertando o interesse científico e, desse modo, necessita de mais pesquisas.

Empreender novos esforços, nessa perspectiva, pode contribuir para o emprego biotecnológico desta levedura nos processos de produção de biocombustível, pois, embora recentemente vários trabalhos abordem a existência de um crescente número de outras leveduras capazes de hidrolisar celobiose para produção de álcool (como *Candida queiroziae*) apenas espécies do gênero *Dekkera* comprovaram ser úteis de metabolizar açúcares em etanol e sobreviver nos inóspitos ambientes industriais.

REFERÊNCIAS

BARNETT, J.A; PAYNE, R.W; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge, 1990.

BLOMQVIST, J. ; EBERHARD, T.; SCHNURER, J.; PASSOTH, V. **Fermentations characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains**. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 2010.

BORNEMAN, AR; ZEPPEL, R; CHAMBERS, PJ; CURTIN, CD. **Insights into the *Dekkera bruxellensis* genomic landscape: comparative genomics reveals variations in ploidy and nutrient utilisation potential amongst wine isolates**. PLoS Genet, 2014.

DE BARROS PITA, W. et al. **The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes**. Antonie van Leeuwenhoek (Gedruckt). v.100, p.99 – 107, 2011.

DELIA, M.L.; PHOWCHINDA, O.; ALFENORE, S.; STEHAIANO, P. **Brettanomyces as a polluting yeast in alcoholic fermentations: study of its relations to Saccharomyces**. Juiz de Fora - MG, 2006.

GALAFASSI, S. et al. ***Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions**. Journal of Industrial

Microbiology & Biotechnology.

LEITE, F. C. et al. **High intracellular trehalase activity prevents the storage of trehalose in the yeast.** Letters in Applied Microbiology, v. 63, p. 210-214, 2016.

LIMA, U.A; BASSO, L.C; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.) **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. **Spoilage yeasts in the wine industry.** **International Journal of Food Microbiology.** Amsterdam, 2003.

Mendes, K.D., Silveira, R.C.C.P., Galvao, C.M. **Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem.** Florianópolis, 2008.

ROZPEĐOWSKA, E; HELLBORG, L; ISHCHUK, O. P; ORHAN, F; GALAFASSI, S; MERICO, A; WOOLFIT, M; COMPAGNO, C; PIŠKUR, J. **Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in Saccharomyces and Dekkera yeasts.** Nature communications, v. 2, p. 302, 2011.

SILVA, R.B.O. **Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1994.

Souza Liberal. **Validação de genes de referência para análises de expressão gênica por PCR em Tempo Real em Dekkera bruxellensis.** In: 27ª Reunião de Genética de Microrganismos, Guarujá-SP 2010.

_____. **Identification of Dekkera bruxellensis as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation.** Journal of Applied Microbiology, Oxford, 2007.

WHEALS, E.A., BASSO, L.C., Alves, D.M.G. and AMORIM, H.V. **Fuel etanol after 25 years.** Trends in Biotechnology, 1999.